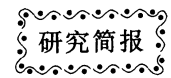


DOI: 10.3724/SP.J.1006.2010.01221



条锈菌诱导的小麦 bZIP 转录因子基因的克隆及表达分析

张毅¹ 夏宁¹ 张岗¹ 郭军¹ 黄丽丽¹ 康振生^{1,2,*}

¹西北农林科技大学植物保护学院, 陕西杨凌 712100; ²西北农林科技大学陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西杨凌 712100

摘要: 采用电子克隆和 RT-PCR 方法, 从条锈菌诱导的小麦品种水源 11 的 cDNA 中分离到一个编码 bZIP 转录因子基因的 cDNA 序列, 暂被命名为 *TabZIP*。*TabZIP* 包含一个完整的 1 071 bp 的开放阅读框, 编码 356 个氨基酸, 具有典型的 bZIP 保守结构域; 与水稻、玉米、拟南芥等植物 bZIP 蛋白的氨基酸序列相似性较高; *TabZIP* 基因在小麦根中的表达量丰富, 而在茎和叶中表达量很小; 在小麦与条锈菌非亲和组合中, *TabZIP* 基因高水平表达, 而在亲和组合中没有明显的变化; 防卫相关激素乙烯、茉莉酸也可诱导该基因的快速上调表达, 表明 *TabZIP* 可能通过乙烯、茉莉酸信号途径介导小麦对条锈病的防御反应。

关键词: 小麦; 条锈菌; bZIP 转录因子; 电子克隆; 基因表达

Cloning and Expression Analysis of a bZIP Transcription Factor Gene in Wheat Induced by Stripe Rust Pathogen

ZHANG Yi¹, XIA Ning¹, ZHANG Gang¹, GUO Jun¹, HUANG Li-Li¹, and KANG Zhen-Sheng^{1,2,*}

¹College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; ²Shaanxi Provincial Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

Abstract: In plant, basic leucine zipper (bZIP) transcription factors play various roles in developmental processes and in response to biotic and abiotic stimuli. In the present study, a novel bZIP gene, designated as *TabZIP*, was isolated from wheat leaves infected by *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* using in silico cloning and reverse transcription PCR approaches. *TabZIP* was predicted to encode a 356 amino-acid protein, which contained a bZIP transcription factor basic domain signature and a leucine zipper motif. Multiple alignment analysis based on the amino acids encoded by different bZIP genes from rice (*Oryza sativa*), maize (*Zea mays*), *Arabidopsis thaliana*, indicated that *TabZIP* was conserved among the three species of plants with highly sequence similarity. The transcript level of *TabZIP* was relatively high in root, but low in stem and leaf. Real-time PCR analysis revealed that *TabZIP* gene was rapidly and dramatically induced during incompatible interaction, whereas there was no significant effect in compatible interaction. Meanwhile, the expression of *TabZIP* was also induced by exogenous methyl jasmonate and ethephon. On the basis of these results, we postulate that the transcription factor encoded by gene *TabZIP* may be involved in wheat defense response to stripe rust fungus infection through ethylene- or jasmonic acid-dependent signal transduction pathways.

Keywords: Wheat; Stripe rust fungus; bZIP transcription factor; in-silico cloning; Gene expression

由条形柄锈菌(*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*)引起的小麦条锈病, 是一种广泛流行的世界性气传病害, 其大面积暴发常会造成小麦产量大幅度下降, 甚至绝收。国内外的研究和实践证明, 选育并合理利用抗锈品种是控制小麦条锈病最经济、最安全、最有效的方法^[1]。揭示小麦对条锈病的防御机制, 发掘重要的抗病相关基因, 对于开展小麦抗锈分子育种新途径非常重要。

植物与病原的互作中, 植物以多种抗病机制抵御病

原物的侵染。植物与病原物相互识别, 交换信息, 同时植物体内也发生了一系列的信号传递, 植物激素水杨酸(salicylic acid, SA)、茉莉酸(jasmonic acid, JA)、乙烯(ethylene, ET)在防卫信号传导途径中起着重要的作用, 不同信号转导途径之间协同交叉形成了复杂的调控网络而引起局部或系统抗性^[2-3]。病原菌, 水杨酸, 茉莉酸/乙烯诱导的转录因子在植物防卫基因表达和抗性防御方面发挥重要的调控作用。

本研究由国家自然科学基金重点项目(30930064), 现代农业产业技术体系建设专项, 高等学校学科创新引智计划项目(B07049)和国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD08A05)资助。

*通讯作者(Corresponding author): 康振生, E-mail: kangzs@nwsuaf.edu.cn; Tel: 029-87091312

第一作者联系方式: E-mail: zhangyixn@163.com, 现在陕西省西安市农业技术推广中心植保站工作。张岗现在陕西中医学院药学院、中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所工作。

Received(收稿日期): 2009-12-30; Accepted(接受日期): 2010-03-19.

碱性域亮氨酸拉链(bZIP)是一类重要的与植物防御反应相关的转录因子家族,一些 bZIP 转录因子是信号途径调控网络交叉处的重要成分^[4]。研究证明, bZIP 蛋白在植物发育和衰老,植物防御过程中起着关键性的调控作用,其主要功能是调节基因表达的强度,或应答外源激素和环境的胁迫^[5]。在胁迫条件下, bZIP 转录因子可以与 ABA 诱导基因的启动子区域结合来调节下游靶基因的表达^[6-7]。ABA 信号在植物对非生物胁迫的应答反应中起着非常重要的作用^[8],或防御病原体,或控制靶基因的时空特异性表达。Meng 等^[9]证明 SA、JA 和 ABA 均可诱导水稻 bZIP1(*OsbZIP1*)快速上调表达,并通过 SA 信号途径介导对稻瘟病菌的防御反应。热胡椒经水杨酸和乙烯利处理后, *CabZIP1* 转录因子的表达量增加,且 *CabZIP1* 的瞬时表达在 PR-1 转录水平上会增强, *CabZIP1* 过表达的转基因拟南芥植株,提高了抗细菌感染、耐旱、耐盐的能力^[10]。然而,关于小麦抗病相关 bZIP 转录因子基因的克隆及其表达特性的研究尚未见报道。

本研究从条锈菌诱导的小麦叶片中分离出一个编码 bZIP 转录因子基因的 cDNA 序列,暂命名为 *TabZIP* (GenBank 登录号为 GQ26689),并对其初步生物学分析和表达谱分析,以期为进一步探讨其在小麦抗条锈病过程中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试小麦品种为水源 11,生长 2 周左右的幼苗根、茎和叶用于不同组织表达研究。小麦条锈菌条中 23 号和条中 31 号生理小种由西北农林科技大学植物病理研究所提供。小麦品种水源 11 与 CYR23 生理小种呈非亲和反应,与 CYR31 生理小种呈亲和反应。按康振生等^[11]的方法进行小麦幼苗的培育和条锈菌的接种。分别在接种后 0、12、18、24、48、72 和 120 h 时取样,以涂抹无菌水的小麦叶片为对照,留部分叶片鉴定反应型。参照 Zhang 等^[12]的方法用水杨酸、乙烯和茉莉酸甲酯处理生长 4 周左右的小麦叶片,分别在处理后 0、2、6、12 和 24 h 时取样,以喷施吐温 20 为对照,剪取的叶片迅速置于液氮中,-80℃ 保存备用。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成

采用 BIOZOL 试剂(BioFlux)提取各取样时间点叶片总 RNA。第一链 cDNA 的合成按照 Invitrogen 公司的 M-MLV reverse transcriptase 试剂盒操作说明进行。其中,用于半定量 RT-PCR 的 cDNA 以 Oligod(T)18 为引物反转录合成,用于 *TabZIP* 克隆和实时定量 PCR 的 cDNA 以 pd(N)6 随机引物合成。

1.3 *TabZIP* 的全长 cDNA 克隆

使用水稻 *OsbZIP* (GenBank 登录号为 ABA92073)基因氨基酸序列在小麦 EST 数据库中进行小麦 *TabZIP* 基因电子克隆的同源检索,在 NCBI 小麦 EST 数据库中筛选,获得若干与之有高度同源性的 EST,将检索到的 EST 序

列用综合序列分析软件 Bioedit 中的 CAP (contig assembly program)程序进行第一次电子延伸,得到第一个重叠群。以此序列为探针再进行 NCBI 的 BLASTn 检索,重复以上过程,直至没有更多的重叠 EST 检出,重叠群不能延伸为止。并利用 NCBI 网站的 ORF finder 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)预测拼接序列的开放阅读框(ORF)。使用 Primer Premier 5.0 软件在预测的开放阅读框两侧设计特异引物,得到一对能有效扩增 *TabZIP* 的引物(FP: 5'-TGGATTAGTGCGAGGCTTT-3'; RP: 5'-TGGTTTGGAACCTCACGAGAA-3')。以非亲和组合中各时间点样品的总 RNA 等量混合,经反转录得到的第一链 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,回收目标片段,并克隆、测序。PCR 程序为 95℃ 4 min; 95℃ 30 s, 56℃ 25 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min; 4℃ 保温。PCR 产物被回收后克隆至 pGEM-T easy 载体,采用通用引物 T7 和 SP6 进行测序反应,并在 ABI3130 遗传分析仪上进行双向测序。

1.4 *TabZIP* 序列分析

利用网站资源对 *TabZIP* 进行序列分析。利用 NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>)的 BLAST 在线分析工具对 GenBank 的非冗余蛋白数据库序列进行比对分析;采用 NCBI 的 ORF finder 预测开放阅读框;使用 ExPASy 网站的 Compute pI/MW tool (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)计算蛋白质的等电点及分子量;利用 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterproScan/>)预测结构域和功能位点;根据推测的 *TabZIP* 氨基酸序列,利用 DNAMAN 软件分别进行氨基酸序列同源性比对和进化树分析。

1.5 半定量 RT-PCR 分析

利用改良的 Okubara 等^[13]的方法进行半定量 RT-PCR 分析。先用组成型表达的麦类 β -Tublin 基因(登录号为 U76895)使 cDNA 模板的起始浓度一致,然后用基因特异引物(FP: 5'-GCAGAGAGGAAGGATGGTGTG-3'; RP: 5'-AAGAGTAGGAGGCTGTGGTGG-3')扩增起始浓度一致的根、茎、叶样品 cDNA,进行半定量 RT-PCR 分析。

1.6 实时定量 RT-PCR (real-time quantitative RT-PCR) 分析

根据 *TabZIP* 序列设计定量 PCR 引物, (FP: 5'-AAGTG TCTGCTGAAGAAATGG-3'; RP: 5'-AAGTAGGAGGCTG TGGTGG-3'),小麦 18S rRNA (GenBank 登录号为 AY049040)作为内参基因(FP: 5'-CTGAGAAACGGCTACCACAT-3'; RP: 5'-CCCAAGGTCCAACACTACGAG-3')。应用 ABI PRISM 7500 实时定量 PCR 仪,以各个取样时间点的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。反应体系为 50×SYBR Green 0.5 μL, ROX 0.1 μL, 25×cDNA 1.0 μL, 10×Taq buffer 2.5 μL, 2.5 mmol L⁻¹ MgCl₂, 0.16 mmol L⁻¹ dNTPs, 0.2 μmol L⁻¹ 引物,补水至总体积 25 μL。反应程序为: 95℃ 1 min, 95℃ 10 s, 55℃ 20 s, 72℃ 40 s, 40 个循环。反应结束后分析荧光值变化曲线和融解曲线。每个反应重复 3 次, Mean Qty 值取平均值。用小麦 18S rRNA 和 *TabZIP* 的质粒制作双标准曲线,以各取样时间点小麦 18S rRNA 的量为标准来确定目

标基因的相对量。

以 ABI PRISM 7500 分析软件计算平均表达量, *P* 值评估不同时间点表达量的变化。当 *P* < 0.05 时接种后各时间点表达量差异显著。每样品 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 *TabZIP* 的全长 cDNA 克隆和序列分析

小麦 bZIP EST 经电子延伸后, 得到一个 1 835 bp 的序列。经 ORF finder 预测, 具有完整的开放阅读框。利用已设计的 RT-PCR 引物进行扩增, 得到期望长度的产物, 经克隆、测序分析, 其序列与电子延伸结果相似性高达 99.9%。序列从 181 位到 1 251 位核苷酸为开放阅读框, 长 1 071 bp, 编码 356 个氨基酸。Blastn 分析发现, 该序列与水稻、拟南芥等植物的 bZIP 转录因子基因全长 cDNA 序

列高度相似, 且开放阅读框范围基本一致。因此, 认为已克隆到的基因有完整的开放阅读框, 将其命名为 *TabZIP* (GQ26689)。

由 *TabZIP* 的 ORF 推测所编码的蛋白, 经 Compute pI/MW 软件预测, 其等电点为 8.61, 分子量为 39 428.98 Da。利用 InterProScan 对 *TabZIP* 所编码蛋白的结构域和功能位点进行分析, 发现其含有 bZIP 功能域, 从第 213 位到第 275 位的肽段与 BRLZ (basic region leucine zipper) 和 (bZIP transcription factor) 具有高度的同源性, 且含亮氨酸重复序列。

氨基酸序列同源比对分析结果表明(图 1), *TabZIP* 编码的氨基酸序列与水稻(ABA92073)、玉米(ACG27603)、拟南芥(NP_176108)、蓖麻(EEF29352)等 bZIP 转录因子编码的氨基酸序列高度相似, 且均含有典型 bZIP 保守结构域。

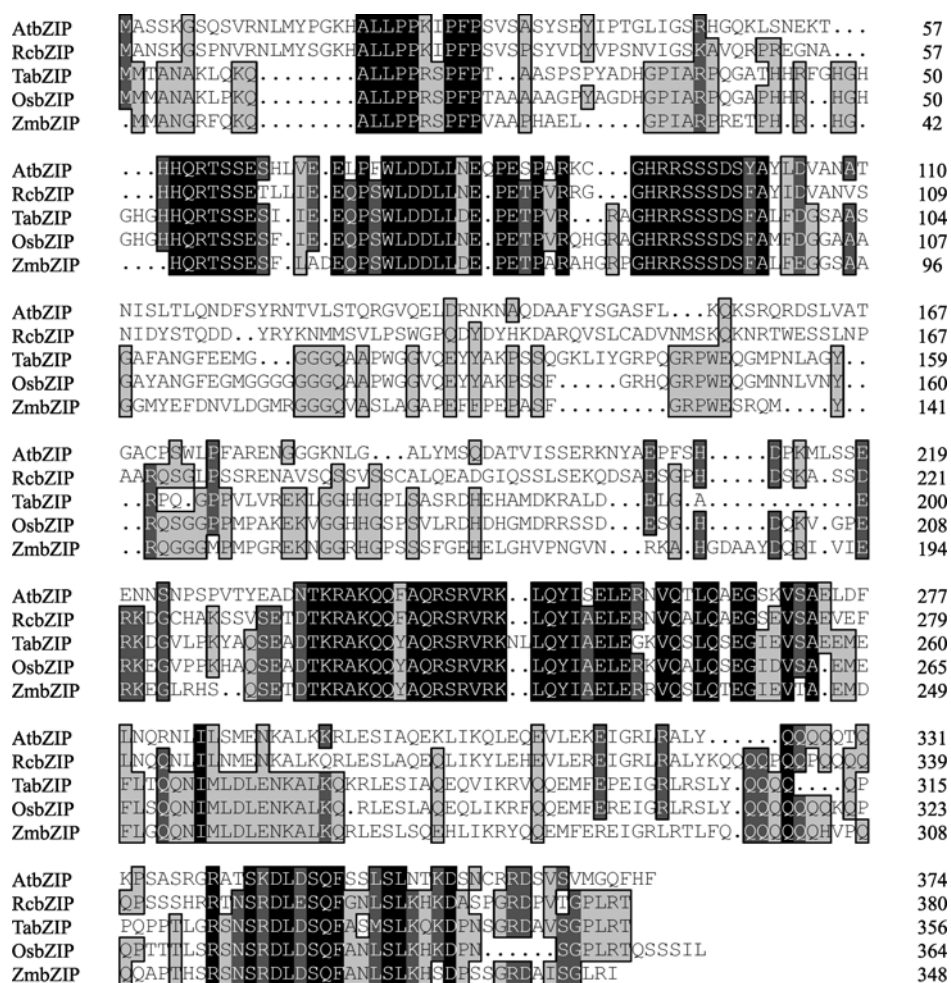


图 1 *TabZIP* 基因与其他植物 bZIP 基因编码的蛋白序列比对

Fig. 1 Comparison of amino acid sequences of *TabZIP* and other bZIP domain proteins

黑色表示 5 个氨基酸残基全部保守, 深灰色表示 4 个氨基酸残基保守, 下划线部分为 bZIP 结构域。

At: 拟南芥; Rc: 蓖麻; Zm: 玉米; Os: 水稻; Ta: 小麦。

Amino acid residues conserved in all the five sequences are shaded in black. Residues shared in drak gray are conserved in four sequences. bZIP domains are underlined. At: *Arabidopsis thaliana* (GenBank accession No. NP_176108), Rc: *Ricinus communis* (EEF29352), Zm: *Zea mays* (ACG27603), Os: *Oryza sativa* (ABA92073), Ta: *Triticum aestivum* (GQ26689).

系统进化分析表明(图 2), *TabZIP* 属于单子叶植物家族, 与水稻亲缘关系最近, 玉米次之, 与双子叶植物拟南芥等亲缘关系较远。

2.2 *TabZIP* 的组织表达分析

TabZIP 在根中的表达量远远高于在茎和叶中的表达量(图 3)。

2.3 *TabZIP* 基因的诱导表达分析

TabZIP 基因的转录表达受条锈菌的诱导(图 4), 在小麦与条锈菌非亲和组合中, 接种后 18 h 前 *TabZIP* 表达量呈上升趋势, 18 h 达最大, 是 0 h 对照的 4.96 倍, 之后有所下降, 但仍明显高于 0 h 对照。在亲和组合中, *TabZIP* 总体表达无明显变化, 各时间点表达量均近似 0 h 对照。说明 *TabZIP* 可能参与小麦对条锈菌的防御反应。

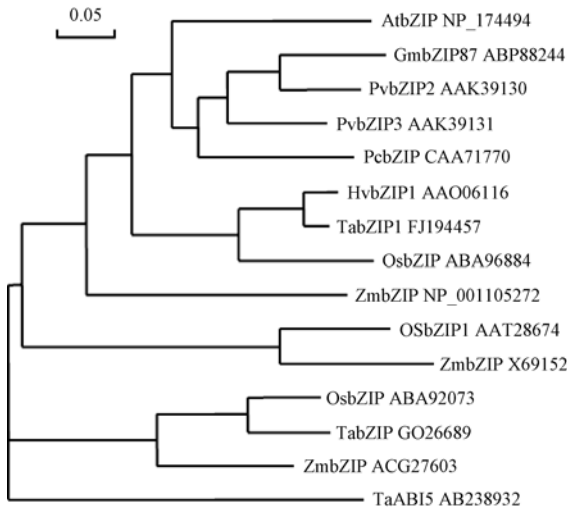


图 2 *TabZIP* 与其他 bZIP 转录因子的进化树分析
Fig. 2 Phylogenetic tree of *TabZIP* and other bZIP transcription factors

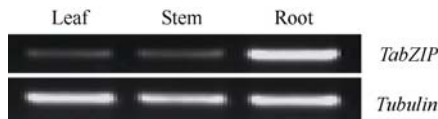


图 3 *TabZIP* 在不同组织中的表达模式
Fig. 3 Transcription profile of *TabZIP* in different wheat organs

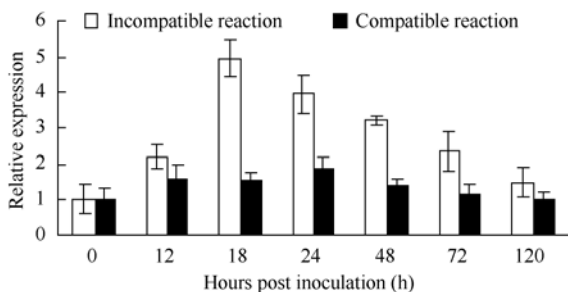


图 4 *TabZIP* 在非亲和与亲和组合中不同时间点的表达特征
Fig. 4 Transcription pattern of *TabZIP* in incompatible interaction and compatible interaction at different time points post inoculation

外源激素也可诱导 *TabZIP* 的表达(图 5)。MeJA 处理后 6 h 前表达量迅速升高, 至 6 h 达到峰值, 12 h 有所下降, 24 h 表达量与对照基本趋于一致; ET 处理后, *TabZIP* 的表达量在 2 h 内快速上调, 达到峰值, 6 h 时后开始缓慢下降; 而 SA 处理后, *TabZIP* 的表达无明显变化。

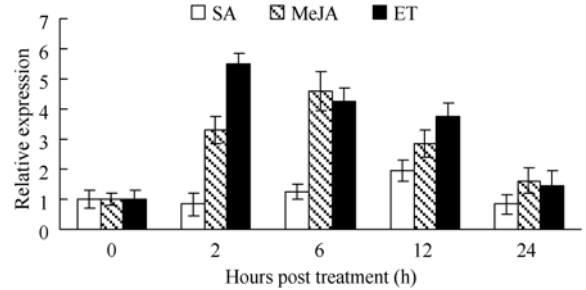


图 5 用实时定量 PCR 分析不同激素诱导小麦 *TabZIP* 表达谱
Fig. 5 Real-time PCR analysis of the expression of *TabZIP* in wheat induced by SA, MeJA and ethylene
SA: salicylic acid; MeJA: methyl jasmonate; ET: etyphenon.

3 讨论

转录调控已成为植物防卫反应研究中最具活力的领域之一, 转录因子通过调节抗病相关信号途径或激活抗病基因的表达来调节植物对病原物的防御反应, 解析植物防御系统中的调控基因和转录调控信号途径对理解植物防御机制十分重要。本研究分离出的小麦 bZIP 基因 *TabZIP*。像其他 bZIP 蛋白一样, 例如 *OsbZIP*^[14]、*ZmbZIP*^[15], 均包含一个 bZIP 转录因子的典型结构和一个含 3 个重复亮氨酸的拉链结构域。*TabZIP* 蛋白与 *OsbZIP* 和 *ZmbZIP* 的蛋白同源性很高, 与 *OsbZIP* 的亲缘关系最近, 说明 *TabZIP* 基因编码的可能是一个 bZIP 转录因子蛋白。

植物 bZIP 转录因子在植物根中高丰度表达, 而在茎和叶中的表达量很低, 甚至不表达^[9,16]。本研究同样发现 *TabZIP* 基因在小麦根中的表达量远高于在茎和叶中的表达量, 这也与拟南芥 *TGA1*、*OBF4*^[17]和烟草 *TGAla*^[18]组织表达模式相一致。

植物对病原物侵染的防御反应通常由植物与病原物互作初期产生的信号分子激发。在小麦与条锈病互作的非亲和组合中, *TabZIP* 的表达在互作前期被快速诱导, 最大表达量发生在接种后 18 h, 本实验室前期研究表明小麦与条锈菌互作的非亲和组合中, 由过敏反应引起的细胞坏死发生在侵入后 24 h^[19-20]。因此, 推测 *TabZIP* 调控小麦对条锈菌的抗性反应。

水杨酸、茉莉酸和乙烯是植物抵御病原物侵入的 3 个重要信号调节分子, 水杨酸和乙烯/茉莉酸途径被认为是两个不同的植物防御反应信号途径^[2]。外源乙烯和茉莉酸甲酯能够诱导 *TabZIP* 快速高水平表达(2 h 和 6 h), 而其表达量不被水杨酸诱导, 说明 *TabZIP* 可能通过 ET/MeJA 信号途径介导小麦对条锈菌的防御反应。但是 *TabZIP* 如何参与小麦对条锈菌的防御反应, 有待进一步研究。

References

- [1] Chen X M. Epidemiology and control of stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) on wheat. *Can J Plant Pathol*, 2005, 27: 314–337
- [2] Jia Y-T(贾燕涛). Plant disease resistance signaling pathways. *Chin Bull Bot (植物学通报)*, 2003, 20(5): 602–608 (in Chinese with English abstract)
- [3] Glazebrook J. Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*-2001 status. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4: 301–308
- [4] Singh K B, Foley R C, Onate-Sánchez L. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5: 430–436
- [5] Jakoby M, Weisshaar B, Droge-Laser W, Tiedemann J, Kroij T, Parcy F. The family of bZIP transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Trends Plant Sci*, 2002, 7: 106–111
- [6] Kim S Y, Thomas T L. A family of basic leucine zipper proteins bind to seed-specification elements in the carrot *Dc3* gene promoter. *J Plant Physiol*, 1998, 152: 607–613
- [7] Niu X P, Renshaw-Gegg L, Miller L, Guiltinan M J. Bipartite determinants of DNA-binding specificity of plant basic leucine zipper proteins. *Plant Mol Biol*, 1999, 41: 1–13
- [8] Fujita M, Fujiata Y, Noutoshi Y, Takshashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-shinozaki K, Shinozaki K. Crosstalk between abiotic and biotic stress response: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr Opin Plant Biol*, 2006, 9: 436–442
- [9] Meng X B, Zhao W S, Lin R M, Wang M, Peng Y L. Identification of a novel rice bZIP-Type transcription factor gene, *OsZIP1*, involved in response to infection of *Magnaporthe grisea*. *Plant Mol Biol*, 2005, 23: 301–313
- [10] Lee S C, Choi H W, Hwang I S, Choi D S, Hwang B K. Functional roles of the pepper pathogen-induced bZIP transcription factor, *CAbZIP1*, in enhanced resistance to pathogen infection and environmental stresses. *Planta*, 2006, 224: 1209–1225
- [11] Kang Z-S(康振生), Li Z-Q(李振岐). Discovery of pathogenic isolates of stripe rust on cultivar Lovrin 10 at normal temperature. *J Northwest Agric Coll (西北农学院学报)*, 1984, 12(4): 18–28 (in Chinese with English abstract)
- [12] Zhang H B, Zhang D B, Chan J, Yang Y H, Huang Z J, Huang D F, Wang X C, Huang R F. Tomato stress-responsive factor *TSRF1* interacts with ethylene responsive element GCC box and regulates pathogen resistance to *Ralstonia solanacearum*. *Plant Mol Biol*, 2004, 55: 825–834
- [13] Okubara P A, Blechl A E, McCormick S P, Alexander N J, Dill-Macky R, Hohn T M. Engineering deoxynivalenol metabolism in wheat through the expression of a fungal trichothecene acetyltransferase gene. *Theor Appl Genet*, 2002, 106: 74–83
- [14] The Rice Chromosomes 11 and 12 sequencing Consortia. The sequence of rice chromosomes 11 and 12, rich in disease resistance genes and recent gene duplications. *BMC Biol*, 2005, 3: 20
- [15] Alexandrow N N, Brover V V, Freidin S, Troukhan M E, Tatarinova T V, Zhang H, Swaller T J, Lu Y P, Bouck J, Flavell R B, Feldmann K A. Insights into corn genes derived from large-scale cDNA sequencing. *Plant Mol Biol*, 2009, 69: 179–194
- [16] Zhang Y, Zhang G, Xia N, Wang X J, Huang L L, Kang Z S. Cloning and characterization of a bZIP transcription factor gene in wheat and its expression in response to stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2009, 73: 88–94
- [17] Pater S, Pham K, Memelink J, Kijne J. Binding specificity and tissue-specific expression pattern of the *Arabidopsis* bZIP transcription factor *TGA2*. *Mol Gen Genet*, 1996, 250: 237–239
- [18] Katagiri F, Lain E, Chua N H. Two tobacco DNA-binding proteins with homology to the nuclear factor CREB. *Nature*, 1989, 340: 727–730
- [19] Wang C F, Huang L L, Buchenauer H, Han Q M, Zhang H C, Kang Z S. Histochemical studies on the accumulation of reactive oxygen species (O_2^- and H_2O_2) in the incompatible and compatible interaction of wheat-*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2007, 71: 230–239
- [20] Kang Z, Huang L, Buchenauer H. Ultrastructural changes and localization of lignin and callose in compatible and incompatible interactions between wheat and *Puccinia striiformis*. *J Plant Dis Prot*, 2002, 109: 25–37